

**GLYCOSYLIERTES SERUMPROTEIN
UND GLYCOSYLIERTES HÄMOGLOBIN:
EINFLUSS EINER ORALEN GLUCOSEBELASTUNG**

**VERBESSERUNG DER BESTIMMUNGSMETHODE
DES GLYCOSYLIERTEN SERUMPROTEINS**

DIEMUD KAISER

*Diss.
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dr. von Haunerschen Kinderklinik
der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med. H.-B. Hadorn

Glycosyliertes Serumprotein und glycosyliertes Hämoglobin:
Einfluß einer oralen Glucosebelastung.
Verbesserung der Bestimmungsmethode des glycosylierten
Serumproteins.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Diemud Kaiser
aus
München
Jahr
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Y. S. Shin-Zoulek

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen
Prüfung:

17. 10. 1985

Meinen Eltern

Ich danke Herrn Manfred Rieth für die freundliche Unterstützung im Labor, sowie besonders auch den Probanden für den Glucosebelastungstest.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>A. Einleitung</u>	1
Entstehung und klinische Bedeutung der Glycosylierung von Proteinen, im besonderen des Hämoglobins und der Serumproteine.	
<u>B. Methodik</u>	
1. Probanden.	8
2. Behandlung und Aufbewahrung der Proben	9
3. Geräte	10
4. Chemikalien.	11
5. Bestimmungsmethoden.	12
I. Glycosyliertes Hämoglobin.	12
a) Colorimetrische Methode.	12
b) Hämoglobinbestimmung	14
c) Chromatographische Bestimmung.	15
II. Glycosyliertes Serumprotein.	17
a) Colorimetrische Bestimmung	17
b) Micro-Proteinbestimmung.	19
III. Blut- und Uringlucosebestimmung.	20
<u>C. Ergebnisse</u>	
I. Glycosyliertes Serumprotein.	22
II. Glycosyliertes Hämoglobin.	22
a) Colorimetrische Bestimmung	22
b) Chromatographische Bestimmung.	23
III. Blut- und Uringlucose.	23
IV. Korrelationen.	29
V. Oraler Glucosebelastungstest	36

D. Diskussion

I. Glycosyliertes Serumprotein.	42
a) Methode.	42
b) Korrelation mit gleichzeitig bestimmten Laborwerten	45
1. Korrelation mit Blut- und Uringlucosewerten	45
2. Korrelation mit dem glycosylierten Hämoglobin	46
II. Glycosyliertes Hämoglobin.	47
a) Methode.	47
b) Korrelation mit Blut- und Uringlucosewerten.	48
III. Einfluß der oralen Glucosebelastung auf das glycosylierte Hämoglobin und Serumprotein. . . .	49
IV. Klinische Bedeutung der Ergebnisse	54

<u>E. Zusammenfassung.</u>	58
--------------------------------------	----

F. Literatur.	61
-----------------------	----

A. Einleitung

Entstehung und klinische Bedeutung der Glycosylierung von Proteinen, im besonderen des Hämoglobins und der Serumproteine.

Beim Erwachsenen und beim Kind ab dem Alter von etwa 1/2 Jahr setzt sich das Hämoglobin normalerweise aus folgenden Anteilen zusammen: Hb_A und Hb_F , wobei das Hb_F aus zwei α - und zwei γ -Ketten besteht und nur 0.5 % des Gesamthämoglobins ausmacht.

Das Hb_A läßt sich in mehrere Untergruppen auftrennen:

1. Hb_A bzw. Hb_{AO} mit zwei α - und zwei β -Ketten, welches 90 % des Gesamthämoglobins bildet,
2. Hb_{A2} mit zwei α - und zwei σ -Ketten und einem Anteil von 2.5 % am Gesamthämoglobin und
3. Hb_{A1a-c} , welches durchschnittlich zu 4.5 - 8.5 % enthalten ist und wie Hb_{AO} aus zwei α - und zwei β -Ketten besteht.

Letztere werden auch "minor hemoglobins" bzw. "fast hemoglobins" genannt - wegen des kleineren Anteils am Gesamthämoglobin und weil sie bei alkalischem pH in der Elektrophorese eine etwas höhere anodische Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen (42).

Die größte Fraktion dieser schnellen Hämoglobine, das Hb_{A1c} , wurde 1968 erstmals von S. Rahbar (31) beschrieben, der es damals als eine außergewöhnliche Hämoglobinart bei Diabetikern

interpretierte. Es stellte sich jedoch heraus, daß dieses normalerweise vorkommende Hämoglobin bei Diabetikern nur vermehrt vorhanden ist (32). Man entdeckte, daß Hb_{A1c} zwar die gleiche Aminosäuresequenz wie Hb_A hat, jedoch am N-terminalen Ende einer oder beider β -Ketten jeweils ein N-glycosidisch gebundenes Glucosemolekül trägt (2,13). Der Entstehungsmechanismus stellt eine posttranslationale, nicht-enzymatische Reaktion zwischen dem endständigen Valin und der Glucose dar, die weitgehend irreversibel ist.

Dabei finden folgende Reaktionsschritte statt:

1. Das Glucosemolekül lagert sich mit seiner Aldehydgruppe in Form einer reversiblen Schiffschen-Base-Verbindung an die Aminogruppe des Valin an. Die Bildung eines solchen Aldimins läuft schnell ab ($k_1 = 0.3 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ hr}^{-1}$), sie ist wieder vollständig dissoziierbar.
2. Findet nicht die wahrscheinlichere Dissoziation statt ($k_{-1} = 0.33 \text{ hr}^{-1}$), so entsteht durch Amadori-Umlagerung eine Ketoaminform, die Amino-1-deoxyfructose ($k_2 = 0.0055 \text{ hr}^{-1}$). Diese Reaktion ist irreversibel (2,4,13).

Diese Glycosylierungsreaktion ist völlig unspezifisch, kann also prinzipiell mit jeder Aminogruppe auf jedem Protein stattfinden, und gilt grundsätzlich für alle Aldosen und Ketosen. Sie ist vom pH-Wert, dem pK-Wert der betroffenen Aminogruppe - der niedrige pK-Wert der N-terminalen Aminogruppe begünstigt die Reaktion - sowie von Stereochemie und Topologie des Proteins abhängig (5,13).

Als Anlagerungsort am Protein kommen hauptsächlich die α -NH₂-Gruppe von Valin und die ϵ -NH₂-Gruppe von Lysin in Frage, und zwar beim Hämoglobin sowohl auf der α - als auch auf der β -Kette. Nicht nur Glucose, sondern auch Fructose und diese ebenso in phosphorylierter Form können an die Aminogruppe gebunden werden, wobei letztere rascher reagieren als z.B. Glucose, jedoch nicht so bedeutsam sind, da ihre Konzentration im Erythrozyt mindestens 100mal geringer ist (42).

Entsprechend dieser Allgemeingültigkeit der Reaktion entdeckte man mit der Zeit eine Reihe weiterer glycosylierter Hb-Formen, die unter dem Begriff der Glycohämoglobine zusammengefaßt werden, und fand auch an Serumproteinen, Kollagen, Kristallin der Augenlinse, Myelin der Nervenscheide, Basalmembran der Glomerula und anderen Proteinen Glucose in gleicher Weise gebunden vor (42).

Bunn (4) konnte durch isoelektrische Fokussierung folgende Formen der Glycohämoglobine in den einzelnen Hb_A-Fraktionen unterscheiden:

Hb _{AO} :	$(\alpha\text{-Val-Glc})_2\beta_2$	
	$(\alpha\text{-Lys-Glc})_2\beta_2$	ca. 8 % des Gesamthämoglobin
	$\alpha_2(\beta\text{-Lys-Glc})_2$	
Hb _{A1c} :	$\alpha_2(\beta\text{-Val-Glc})_2$	ca. 4 % des Gesamthämoglobin
Hb _{A1b} :	$\alpha_2(\beta\text{-Val-CHO})_2$	ca. 1 % des Gesamthämoglobin
Hb _{A1a1} :	$\alpha_2(\beta\text{-Val-Glc-6-P})_2$	ca. 1 % des Gesamthämoglobin
Hb _{A1a2} :	$\alpha_2(\beta\text{-Val-CHO-P})_2$	ca. 1 % des Gesamthämoglobin

α und β bezeichnet in dieser Aufstellung die Ketten des Hämoglobins.

Die Entdeckung der nicht-enzymatischen Glycosylierung des Hämoglobins und der Proteine allgemein war deswegen von so großem Interesse, weil man seine Bedeutung in der Diagnostik und Überwachung der diabetischen Stoffwechsellage erkannte. Diese Zusammenhänge wurden besonders für das Hb_{A1c} untersucht. Fitzgibbons et al. (12) fanden heraus, daß die Konzentration des glycosylierten Hämoglobins mit dem Alter der von ihnen untersuchten Erythrozyten zunahm und bei den ältesten Erythrozyten am höchsten war, erklärlich auf Grund der relativen Irreversibilität der Glycosylierungsreaktion und der damit verbundenen Kumulierung von glycosyliertem Hämoglobin in einem Erythrozyt im Laufe seines Lebens. Dabei stellten sie auch fest, daß bei Diabetikern der Grad der Glycosylierung 2 - 3mal größer war als bei Normalpersonen. Zahlreiche Studien ergaben die Abhängigkeit des glycosylierten Hämoglobins vom Blutglucosespiegel und dessen besonders gute Korrelation mit dem Durchschnitt der Blutglucosewerte der vergangenen 1 - 2 Monate, entsprechend der Lebensdauer der Erythrozyten (120 Tage). Damit wurde die Brauchbarkeit für eine längerfristige Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage durch Hb_{A1c} als integriertes Maß der Glucose-spiegel nachgewiesen (7,10,13,21,22,24,37,40,41).

Nach Garlick et al. (14) verhalten sich die übrigen Glycöhämoglobine direkt proportional zum Hb_{A1c} .

Zeitweise wurde der Aussagewert dieses Laborparameters stark in Frage gestellt, als einzelne Autoren in ihren Studien recht unterschiedliche Meßwerte erhielten und die Glycohämoglobine als Langzeitparameter insofern ungeeignet erschienen, als sie in manchen Arbeiten stark vom momentan bestehenden Blutzuckerspiegel abhingen.

Es stellte sich jedoch heraus, daß die unterschiedlichen Ergebnisse durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden zustande kamen, nämlich dadurch, daß in einigen Fällen nicht das eigentliche Glycohämoglobin, sondern auch seine Vorform, die reversible Schiffsche-Base-Verbindung, bestimmt worden war. Daraufhin entstand der Begriff des stabilen und des labilen Glycohämoglobins, die zusammen das totale Glycohämoglobin ergeben. Das labile glycosylierte Hämoglobin, auch "pre-Hb_{A1c}" genannt, und damit das totale Glycohämoglobin verändern sich also parallel zum Blutglucosespiegel und können im Gegensatz zum stabilen glycosylierten Hämoglobin nicht als Langzeitparameter betrachtet werden (1,3,6,9,16,19,20,23,28,34). Im Rahmen der Diskussion wird noch eingehender auf dieses Problem und die Eignung einzelner Bestimmungsmethoden eingegangen.

Wie bereits erwähnt, geschieht diese Glycosylierungsreaktion bei vielen weiteren Proteinen, wobei besonders die Serum-eiweiße für die Diagnostik und Verlaufskontrolle des Diabetes und die glycosylierten Gewebsproteine bezüglich der Ursachenfindung und Prognose der Spätkomplikationen des Diabetes mellitus Verwendung fanden.

Dolhofer und Wieland (11) inkubierten Serum mit radioaktiv markierter Glucose und stellten fest, daß Albumin und α_1 -Globulin, gefolgt von den γ -Globulinfraktionen, den größten Teil der glycosylierten Serumeiweiße ausmachen.

Glucose wird hier fast ausschließlich an die ϵ -Aminogruppe von Lysin gebunden. Glycosyliertes Albumin und glycosyliertes Gesamtserumprotein korrelieren sehr gut untereinander und weitestgehend auch mit der Nüchternblutglucose. Auf Grund der Halbwertszeit des Albumins von etwa 17 Tagen gibt dieser Wert ein gutes Bild der Stoffwechsellage der vorausgegangenen 1-2 Wochen wider und reagiert schneller auf Änderungen der durchschnittlichen Blutglucosekonzentrationen als die Glycohämoglobine auf Grund des vergleichsweise höheren Umsatzes der Serumproteine.

Der unterschiedliche Bezugszeitraum der beiden Werte spiegelt sich auch in der eher mäßigen Korrelation der Glycohämoglobine mit den glycosylierten Serumeiweißen wider (8,11,17,18,26,27,35,39).

Es stellte sich die Frage, inwieweit eine einzige, relativ starke Glucosebelastung Einfluß auf die beiden Parameter nimmt und welcher Wert also durch seine eventuelle Stabilität für die Diabetesbetreuung von größerem Interesse ist. Zusätzlich sollte die bisher von unserem Labor durchgeführte Bestimmungsmethode für glycosyliertes Albumin (35)

verbessert, beziehungsweise dahingehend in seiner Anwendung vereinfacht werden, daß sie als Routinemethode im klinischen Alltag verwendet werden kann.

B. Methodik

1. Probanden

20 Kinder der Dr. von Haunerschen Kinderklinik, die dort teils ambulant, teils stationär in Betreuung waren, dienten als Gruppe der Diabetiker. Das Alter der sämtlich insulinabhängigen Patienten reichte von 2 - 17 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 10.8 Jahre. Es nahmen 10 Mädchen und 10 Buben teil.

Den Kindern wurde postprandial - der Zeitpunkt war durch die Sprechstundentermine bedingt - 2-3 ml venöses Heparinblut entnommen, welches zur Bestimmung des glycosylierten Hämoglobins und der glycosylierten Serumproteine diente. Gleichzeitig wurde in allen Fällen der Blutglucosespiegel bestimmt, bei einigen Patienten auch die renale Glucoseausscheidung pro 24 Stunden aus Proben einer jeweils 3 x 8-stündigen Urinsammelportion des vorhergehenden Tages. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 13 gesunden Erwachsenen (8 Frauen und 5 Männer) im Alter von 24 bis 40 Jahren zusammen.

Die Blutentnahme erfolgte in gleicher Weise wie bei den Kindern.

Dieselbe Personengruppe diente auch für einen weiteren Versuch. Nach Nahrungskarenz übernacht wurden sie einer einmaligen oralen Glucosebelastung mit 50 g Glucose ausgesetzt

und venöses Blut vor Belastung und 1 h, 2 h, 1 Tag, 10 Tage, 20, 30, 45, 60 und 90 Tage nach Belastung abgenommen. Nach der Zuckerbelastung waren die Probanden zu keiner Diät mehr verpflichtet.

2. Behandlung und Aufbewahrung der Proben vor Analyse:

Das heparinisierte Blut wurde möglichst umgehend für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert und die Erythrozyten im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung zweimal gewaschen. Serum und Erythrozytenkonzentrat wurden sofort bei -20° C in Eppendorfgefäßen getrennt eingefroren und erst kurz vor Verwendung wieder aufgetaut.

3. Geräte

- Eppendorf Photometer M1167671
- Eppendorf-Zentrifuge
- Heizblock 37° C
- Autoklave MM München 120° C, 1.2 atü.
- Gefrierschrank Linde -20° C
- Säulenständer Boehringer Mannheim
- Eppendorfgefäß-Ständer zum Autoklavieren nach eigener Anfertigung
- Eppendorfgefäße
- Pipetten
- Einmalküvetten und Glasküvetten
- Einmalreagenzgläser
- Dialysierschlauch der Firma Kalle
- Astra Auto-Analyzer der Firma Beckmann.

4. Chemikalien

- 5-Hydroxymethylfurfural crystalline, Sigma Chemical Company, München
- Oxalsäure $C_2H_2O_4 \cdot 2 H_2O$, Firma Merck, Darmstadt
- 2-Thiobarbitursäure $C_4H_4N_2O_2S$, Firma Merck, Darmstadt
- Trichloressigsäure CCl_3COOH (TCA), Firma Merck, Darmstadt
- D-Glucose, Firma Merck, Darmstadt
- Transformationslösung zur Hb-Bestimmung, Firma Merck, Darmstadt
- Glucose-Hexokinase-Methode, UV-Test, Boehringer Mannheim
- Test-Combination Hämoglobin A_1 (Hb_{A_1}), chromatographischer Test, Boehringer Mannheim
- Proteinbestimmung nach Lowry:
Natriumbicarbonat Na_2CO_3
Natronlauge NaOH
Kupfersulfat $CuSO_4$
Seignettesalz in Na-K-Tartrat
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

5. Bestimmungsmethoden

I. Glycosyliertes Hämoglobin

a) Colorimetrische Bestimmung

(nach Parker et al. (29), modifiziert von Shin et al. (35))

Prinzip

Sämtliche stabile, d.h. Ketoamin-Formen glycosylierter Proteine, in diesem Fall des Hämoglobins, werden mit dieser Methode erfaßt. Die gebundene Glucose wird durch Erhitzen mit Oxalsäure als 5-Hydroxymethylfurfural freigesetzt und anschließend durch die Farbreaktion mit Thiobarbitursäure photometrisch bestimmt.

Reagenzien:

- Aqua dest.
- Oxalsäure 0.5 M
- Trichloressigsäure 40 %-ig (TCA)
- Thiobarbitursäure 0.05 M
- Standardlösungen:

5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) 0.08 mM und 0.16 mM.

Durchführung:

Das aufgetaute Erythrozytenkonzentrat wird mit Aqua dest. 1 : 11 verdünnt. Zu 0.1 ml dieser Erythrozytenverdünnung werden in ein Eppendorfgefäß 0.2 ml Oxalsäure gegeben, gut geschüttelt und fest verschlossen. Bei 120° C und 1.2 atü erhitzt man die Mischung um Autoklaven für 1 h. Jede Probe

wird doppelt bestimmt und ein dritter Ansatz zur Leerwertmessung nicht miterhitzt, unterliegt jedoch ansonsten der gleichen Prozedur wie die übrigen Ansätze.

Nach Abkühlen fällt man das Protein durch Zugabe von 0.2 ml Trichloressigsäure aus und zentrifugiert das denaturierte Eiweiß 5 min lang bei 1500 x g ab. Vom Überstand entnimmt man 0.2 ml, pipettiert 0.05 ml Tiobarbitursäure dazu und erwärmt das Ganze 1/2 h lang bei 37⁰ C. Die so entstandene Farbreaktion wird bei 436 nm in Glasküvetten photometrisch bestimmt. Dabei wird das Gerät gegen Luft geeicht, als Leerwert dient der nicht autoklavierte 3. Ansatz. Die Standardkurve wird mit Hilfe der 5-HMF-Standardlösungen festgelegt, die der gleichen Behandlung wie die Proben unterworfen werden.

Das Ergebnis wird nach Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in nmol HMF/mg Hb angegeben.

b) Hämoglobinbestimmung

Prinzip:

Hämoglobin wird durch Kalium-Ferricyanat in Methämoglobin und dieses durch Kalium-Cyanat in Cyanmethämoglobin umgewandelt, welches photometrisch bestimmt wird.

Reagenzien:

Transformationslösung: Kalium-Ferricyanat	0.05
Kalium-Cyanat	0.20
Natriumbicarbonat	1.00
Aqua dest.	ad 1000 ml

Durchführung:

0.02 ml der Erythrozytenverdünnung (1 : 11) werden mit 2.5 ml Transformationslösung vermischt und nach 20 min in Einmalküvetten bei 546 nm photometrisch gemessen. Als Eichlösung verwendet man Transformationslösung. Der erhaltene Extinktionswert wird mit 18.4 multipliziert. Das Ergebnis stellt die Konzentration des Hämoglobins in g% dar.

$$E_{546 \text{ nm}} \times 18.4 = \text{g\% Hb}$$

Sämtliche Proben werden doppelt bestimmt.

c) Chromatographische Bestimmung

Test-Combination Hämoglobin A₁ (Hb_{A1}) Boehringer Mannheim

Prinzip:

Hämoglobin einer hämolysierten Probe wird an Ionenaustauscher gebunden und fraktioniert eluiert.

Reagenzien:

- Lösung 1 : Hämolys-Reagenz : Detergenz 1 %
- Lösung 2 : Elutionslösung für Hb_{A1}: Phosphatpuffer
ca. 40 mmol/l, pH 6.7
- Lösung 3 : Elutionslösung für andere Hämoglobine: Natrium-
chlorid ca. 400 mmol/l
- Säulen : Kationenaustauscherharz ca. 1 g/Säule
(0.6 x 6 cm Säulen).

Durchführung:

0.05 ml Erythrozytenkonzentrat werden mit 0.2 ml Lösung 1 vermischt und für 10 min inkubiert. Zuerst pipettiert man 0.05 ml des Hämolysats, danach Lösung 2 auf die Säule (0.2 ml). Das gesammelte Eluat wird bei 405 nm photometrisch bestimmt (= Extinktion E₁). Die anderen Hämoglobine werden mit Lösung 3 (4.0 ml) eluiert und ebenfalls im Photometer gemessen (= Extinktion E₂).

Aus beiden Extinktionen wird wie folgt die Konzentration des Hb_{A1} berechnet.

E_1 = Extinktion der Hb_{A1}-Fraktion

E_2 = Extinktion der anderen Hämoglobine

$$\% \text{ Hb}_{A1} = \frac{E_1}{E_1 + 4.75 \times E_2} \times 100$$

II. Glycosyliertes Serumprotein

a) Colorimetrische Bestimmung

Prinzip:

In gleicher Weise wie bei der colorimetrischen Bestimmung des glycosylierten Hämoglobins wird die stabil gebundene Glucose bei hoher Temperatur mit Oxalsäure freigesetzt und das nun entstandene 5-HMF nach Farbreaktion mit Thiobarbitursäure photometrisch ermittelt.

Reagenzien:

- Na-Phosphatpuffer 0.02 M, pH 7.1
- Oxalsäure 1.0 M
- Trichloressigsäure 75 % (TCA)
- Thiobarbitursäure 0.05 M
- Standardlösungen:
5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) 0.015 mM und 0.03 mM.

Durchführung:

Das aufgetaute Serum wird in Phosphatpuffer 24 h dialysiert, wobei die Pufferlösung nach 12 h erneuert wird. Die Probe muß man nun mit Aqua dest. 1 : 21 verdünnen. 0.3 ml dieser Verdünnung werden mit 0.2 ml Oxalsäure im Autoklaven (120° C, 1.2 atü) für 1 h erhitzt und nach Abkühlen mit 0.1 ml TCA enteiweißt. Jede Probe wird doppelt bestimmt und ein dritter Ansatz ohne Autoklavieren zur Leerwertbestimmung durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren des denaturierten Proteins entnimmt man vom Überstand 0.25 ml und inkubiert diese nach Zu-

gabe von 0.05 ml Thiobarbitursäure für 1/2 h bei 37° C.

Die Farbentwicklung mißt man im Photometer bei 436 nm Wellenlänge. Die mit der Standardkurve ermittelten Konzentrationen werden nach Proteinbestimmung in nmol HMF/mg Protein angegeben.

b) Micro-Proteinbestimmung

(modifizierte Lowry-Methode nach Shin-Buehring et al. (36))

Reagenzien:

- Lösung A : 2 % Na_2CO_3 (wasserfrei) in 0.1 N NaOH
- Lösung B_a : 5.5 g% CuSO_4
- Lösung B_b : 1.35 g% Seignettesalz in Na-K-Tartrat
- Lösung C : Folin-Ciocalteus-Phenol : Lösung A im
Verhältnis 1 : 1.

Mischungen werden immer frisch angesetzt!

- Lösung B : 0.2 ml B_b + 0.02 ml B_a → 0.22 ml B
- Lösung D : 5 ml A + 0.1 ml B → 5.1 ml D
- Standardlösungen : Rinderalbumin in Konzentrationen von
0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml

Durchführung:

Die Serumverdünnung (1 : 21) aus der HMF-Bestimmung wird nun nochmals 1 : 21 weiterverdünnt. 0.02 ml davon läßt man zusammen mit 0.2 ml frischem Kupferreagenz D für 10 min bei Raumtemperatur stehen und pipettiert dann 0.02 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz dazu. Dieses Gemisch muß für 30 min in die Dunkelheit gestellt werden und kann anschließend bei 772 nm in Mikroküvetten photometrisch bestimmt werden. Das Gerät wird gegen Luft geeicht. Sämtliche Proben werden doppelt bestimmt und aus der Standardkurve die entsprechenden Konzentrationen in mg/ml abgelesen.

III. a) Blutglucosebestimmung mit der Hexokinase-methode
(Test-Kombination Boehringer Mannheim)

Prinzip: Enzymatischer Test

Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{Hexokinase (HK)}}$ Glucose-6-P + ADP

Glucose-6-P + NADP $\xrightarrow{\text{Glucose-6-P-DH}}$ Gluconat-6-P + NADPH + H

Reagenzien:

- Triäthanolaminpuffer 0.3 M, pH 7.4
+ MgSO_4 4 mM
- NADP 12 mM
- ATP 15 mM
- 125 U/ml Hk/G-6-P-DH
- Perchlorsäure 0.33 N (PCA)
- Glucosestandardlösungen 5 mg% und 15 mg%.

Durchführung:

0.05 ml Serum wird mit 0.25 ml PCA enteiweißt und der Überstand nach dem Zentrifugieren mit Aqua dest. 1 : 4 verdünnt. Davon werden 0.02 ml mit 0.25 ml Pufferlösung vermischt und erst mit 0.02 ml NADP, dann der gleichen Menge ATP versetzt. Nach Zugabe von 0.002 ml Hk/G-6-P-DH muß das Gemisch 20 min stehengelassen werden. Anschließend wird die gebildete NADPH-Menge bei 334 nm Wellenlänge und Eichung gegen Luft photometrisch ermittelt. Die Standardkurve legt man mit Hilfe der Glucoselösungen und Aqua dest. fest.

b) Uringlucosebestimmung

Die Uringlucose wurde im Astra Auto-Analyzer der Firma Beckmann gemessen. Vor Verwendung der Probe wurde der Glucosegehalt des Urins semiquantitativ bestimmt und die Probe entsprechend verdünnt.

C. Ergebnisse

I. Glycosyliertes Serumprotein

Es konnte eine deutliche Verbesserung der Abspaltung der Glucose in Form von 5-HMF durch Erhitzen der Serumprobe, nach Zugabe von Oxalsäure, im Autoklaven auf 120°C und 1.2 atü und damit eine genauere Bestimmung des glycosylierten Proteins erzielt werden. Die Reaktionszeit konnte dabei auf etwa $1/4$ der bisher üblicherweise benötigten Zeit verkürzt werden. Bei Normalpersonen (in der Kontrollgruppe) (Tab. 1) lagen die Werte zwischen 2.61 und 3.60 nmol HMF/mg Protein, der Durchschnittswert betrug 3.19 nmol HMF/mg Protein. Unter Einbeziehung der Werte, die der Versuch mit der oralen Glucosebelastung ergab, erhält man einen Normbereich von 2.40 - 3.69 nmol HMF/mg Protein bei einem Mittelwert von 3.12 nmol HMF/mg Protein (Tab. 6). Die Diabetiker zeigten Werte von 3.63 - 7.11 nmol HMF/mg Protein, im Durchschnitt 4.68 nmol HMF/mg Protein (Tab. 1).

II. Glycosyliertes Hämoglobin

a) Colorimetrische Bestimmung: Gesamtes stabiles glycosyliertes Hämoglobin (GHb)

Der Normbereich für das GHb reichte in der Kontrollgruppe von 2.06 bis 2.98 nmol HMF/mg Hb mit einem Durchschnittswert von 2.61 nmol HMF/mg Hb (Tab. 2). Unter Berücksichtigung der Werte aus dem Glucosebelastungsversuch erstreckt sich der

Normbereich von 2.06 bis 3.18 nmol HMF/mg Hb bei einem Mittelwert von 2.69 nmol HMF/mg Hb (Tab. 5).

Die Diabetiker zeigten Werte über 3.25 bis maximal 9.60 nmol HMF/mg Hb. Der Durchschnittswert betrug 4.83 nmol HMF/mg Hb (Tab. 2).

b) Säulenchromatographische Bestimmung: Hb_{A1}

Den Angaben des Herstellers für Stoffwechselgesunde (5 - 8 % Hb_{A1}) entsprechend zeigte die Kontrollperson einen Hb_{A1}-Wert von 7.5 %. Bei den Diabetikern rangierten die Werte zwischen 11.31 und 18.47 % Hb_{A1}. Als Mittelwert ergab sich 14.46 % Hb_{A1} (Tab. 3).

Diese Bestimmung wurde nur bei ein paar Probanden zum Vergleich mit der colorimetrischen Methode durchgeführt.

III. Blutglucose und Uringlucose

Die Diabetiker wurden entsprechend den Ergebnissen dieser beiden Werte in zwei Gruppen eingeteilt. Als recht gut eingestellt galten Kinder, die am Tag der Blutentnahme Blutglucosewerte unter 200 mg% und eine renale Glucoseausscheidung von höchstens 1 g/d vorwiesen (= Gruppe A, n = 11), Patienten mit höheren Werten wurden als schlecht eingestellt eingestuft (= Gruppe B, n = 14).

Gruppe A zeigte einen durchschnittlichen Blutglucosespiegel von 140 mg%, die renale Glucoseausscheidung lag im Mittel bei 0.148 g/d.

Der durchschnittliche Blutglucosespiegel von Gruppe B war 242 mg%, die Glucoseausscheidung im Urin betrug im Mittel 10.3 g/d.

Die Blutglucosekonzentrationen der Kontrollpersonen lagen im Normbereich, sie wiesen alle einen unauffälligen Glucosebelastungstest auf.

Tabellen

Tabelle 1: Glycosyliertes Serumprotein bei Stoffwechsel-
gesunden und Diabetikern

Einheit : nmol HMF/mg Protein

Gruppe	n	$\bar{x}$	Bereich
Gesunde	13	3.19	2.61 - 3.60
Gruppe A	11	4.31	3.64 - 6.50
Gruppe B	14	4.97	3.63 - 7.11
Gruppe A und B	25	4.68	3.63 - 7.11

Tabelle 2: Glycosyliertes Hämoglobin (colorimetrisch bestimmt)
bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern

Einheit : nmol HMF/mg Hämoglobin

Gruppe	n	$\bar{x}$	Bereich
Gesunde	13	2.61	2.06 - 2.98
Gruppe A	11	4.42	3.25 - 7.56
Gruppe B	14	5.16	3.40 - 9.60
Gruppe A und B	25	4.83	3.25 - 9.60

Tabelle 3: Hb_{A1} (säulenchromatographisch bestimmt)
bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern

Einheit : % Hb_{A1}

Gruppe	n	$\bar{x}$	Bereich
Gesunde	1	7.5	7.5
Gruppe A und B	5	14.46	11.31 - 18.47

Tabelle 4: Einzelwerte der Diabetiker

Einheit: GSP : nmol HMF/mg Protein

GHb : nmol HMF/mg Hämoglobin

Blutglucose : mg%

Uringlucose : g/d

Gruppe A

GSP	GHb	BZ	UZ
3.73	3.72	178	0.00
4.96	5.93	100	0.00
3.82	3.28	200	n.b. ^x
3.97	4.12	150	0.02
4.12	4.07	130	0.00
4.25	4.28	100	0.00
4.08	3.30	105	n.b. ^x
4.29	4.40	150	n.b. ^x
6.50	7.56	127	n.b. ^x
4.12	4.71	123	n.b. ^x
3.64	3.25	172	0.867
MW: 4.31	4.42	140	0.148

n.b. = nicht bestimmt.

Gruppe B

GSP	GHb	BZ	UZ
3.97	4.18	237	n.b. ^x
6.29	5.96	302	0.00
4.72	6.02	226	0.00
4.45	5.30	227	2.50
4.70	3.87	223	4.00
4.11	3.96	240	n.b. ^x
6.74	6.00	170	24.00
6.67	6.22	290	29.86
3.63	3.40	207	0.00
4.36	3.87	64	20.05
4.51	5.89	215	n.b. ^x
7.11	9.60	300	0.545
4.37	4.20	187	29.42
3.99	3.82	260	3.00
MW: 4.97	5.16	242	10.306

^x_{n.b.} = nicht bestimmt

IV. Korrelationen

Es ergab sich eine sehr gute Korrelation zwischen säulen-
chromatographisch und colorimetrisch bestimmten glycosylier-
tem Hämoglobin mit $r = 0.90$ (Abb. 1).

Die Korrelation zwischen colorimetrisch bestimmten glyco-
syliertem Hb (GHb) und Blut- sowie Uringlucosewerten erwies
sich in beiden Gruppen als relativ niedrig (Abb. 2 und 3):

$\text{GHb/BZ}_A : r = 0.20, \quad \text{GHb/BZ}_B : r = 0.22, \quad \text{GHb/UZ}_A : r = 0.28,$
 $\text{GHb/UZ}_B : r = 0.01.$

Ähnlich schlecht korrelierten die Werte des glycosylierten
Proteins mit denen von Blut- und Uringlucose (Abb. 4 und 5):
 $\text{GSP/BZ}_A : r = 0.18, \quad \text{GSP/BZ}_B : r = 0.15, \quad \text{GSP/UZ}_A : r = 0.24,$
 $\text{GSP/UZ}_B : r = 0.05.$

Hingegen korrelierte das glycosylierte Serumprotein (GSP)
mit dem colorimetrisch bestimmten glycosylierten HB (GHb)
besonders in Gruppe A sehr gut ($r = 0.91$), in Gruppe B mit
 $r = 0.67$ auch relativ eng (Abb. 6). Für Diabetiker und Kon-
trollgruppe zusammen ergab sich ein Korrelationskoeffizient
von $r = 0.82$.

Für sämtliche Werte der Stoffwechselgesunden jedoch, ein-
schließlich derer aus dem Glucosebelastungstest, ließ sich
eine Korrelation von nur $r = 0.16$ ermitteln, wobei die Kor-
relationskoeffizienten der Verlaufswerte der Einzelpersonen
stark differierten und von $r = 0.003$ bis $r = 0.66$ reichten
(Abb. 6).

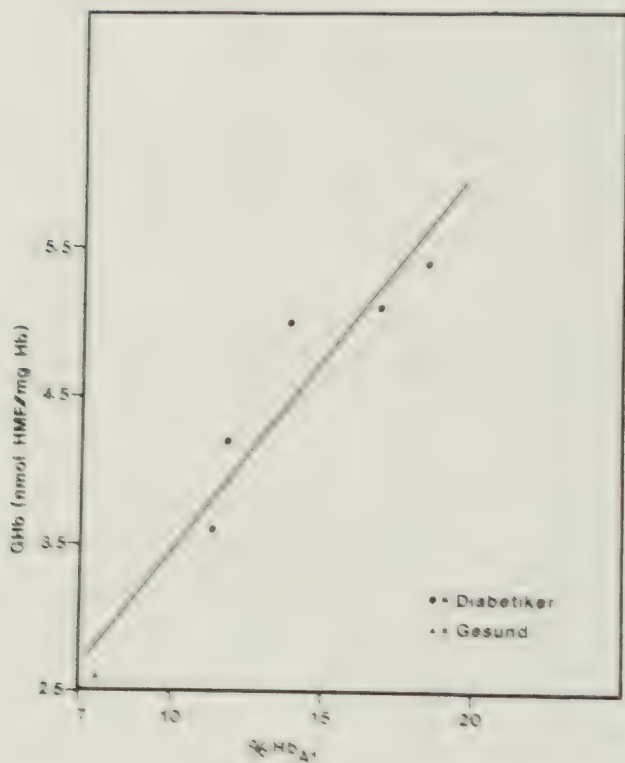


Abb. 1: Korrelation des colorimetrisch bestimmten glycosylierten Hämoglobins mit dem säulen-chromatographisch bestimmten HbA_{1c}.

$$y = \text{GHb} \quad x = \text{HbA}_{1c}$$

$$y = 0.83 + 0.25 x$$

$$r = 0.90$$

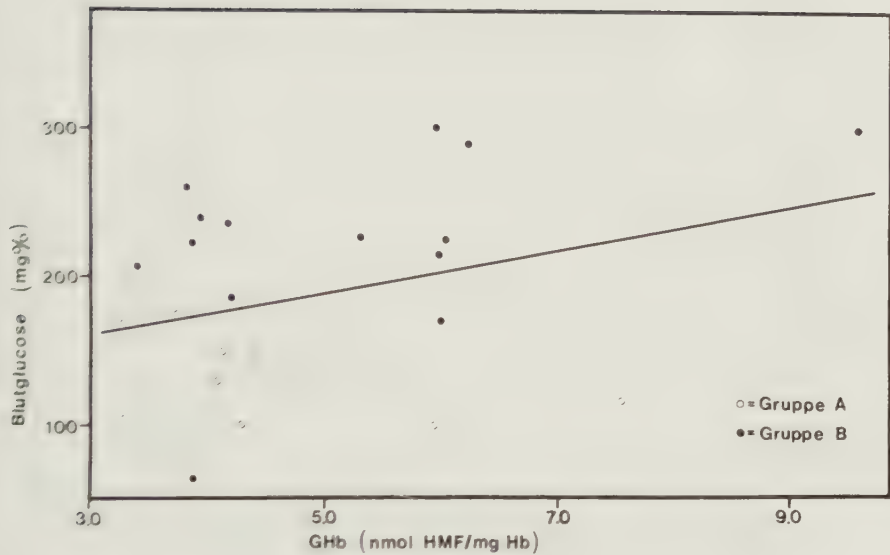


Abb. 2: Korrelation des colorimetrisch bestimmten glycosylierten Hämoglobins mit der Blutglucosekonzentration.

$$y = BZ ; x = GHb$$

$$\text{Gruppe A} : y = 190.24 - 11.47 x \quad r = 0.20$$

$$\text{Gruppe B} : y = 134.48 + 17.50 x \quad r = 0.22$$

$$\text{Gruppe A und B: } y = 116.45 + 14.65 x \quad r = 0.11$$

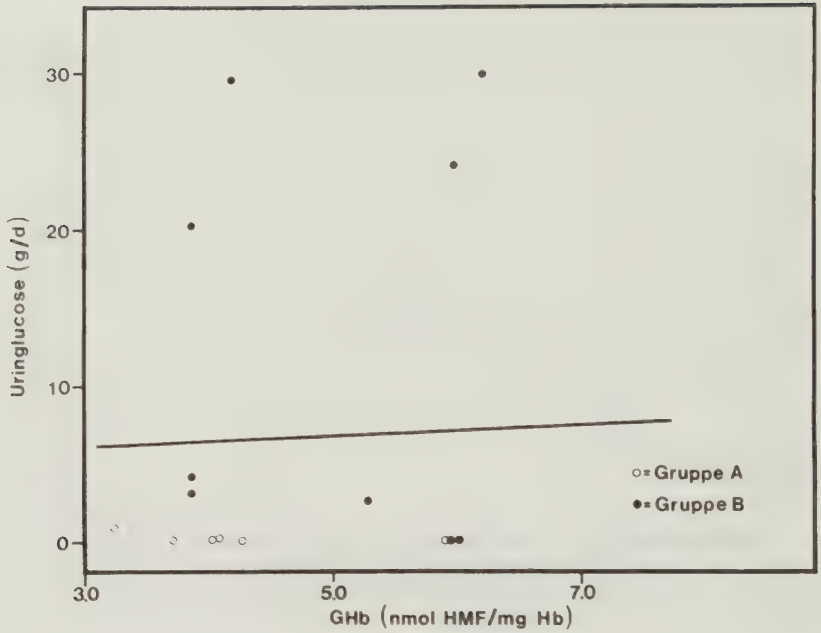


Abb. 3: Korrelation des colorimetrisch bestimmten glycosylierten Hämoglobins mit der Uringlucoseausscheidung.

$$y = \text{UZ} \quad ; \quad x = \text{GHb}$$

$$\text{Gruppe A} \quad : \quad y = 0.01 - 0.20 x \quad r = 0.28$$

$$\text{Gruppe B} \quad : \quad y = 14.32 - 0.76 x \quad r = 0.01$$

$$\text{Gruppe A und B:} \quad y = 4.64 + 0.42 x \quad r = 0.004$$

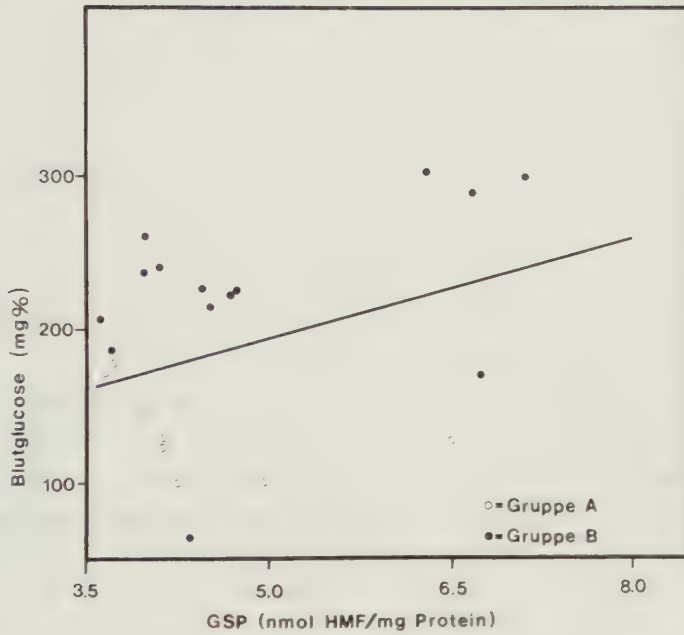


Abb. 4: Korrelation des glycosylierten Serumproteins mit der Blutglucosekonzentration.

$y = \text{BZ} ; \quad x = \text{GSP}$

Gruppe A : $y = 216.28 - 17.78 x \quad r = 0.18$

Gruppe B : $y = 125.05 + 20.07 x \quad r = 0.15$

Gruppe A und B: $y = 85.40 + 21.76 x \quad r = 0.12$

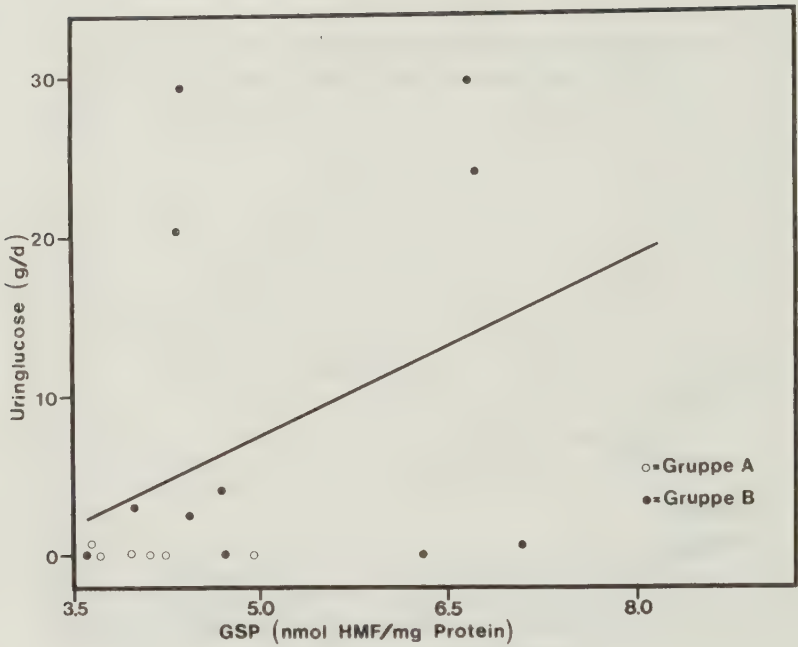


Abb. 5: Korrelation des glycosylierten Serumproteins mit der Uringlucoseausscheidung.

$$y = \text{UZ} ; \quad x = \text{GSP}$$

$$\text{Gruppe A} \quad : \quad y = 1.65 - 0.37 x \quad r = 0.24$$

$$\text{Gruppe B} \quad : \quad y = -1.19 + 2.22 x \quad r = 0.05$$

$$\text{Gruppe A und B: } y = -10.58 + 3.6 x \quad r = 0.14$$

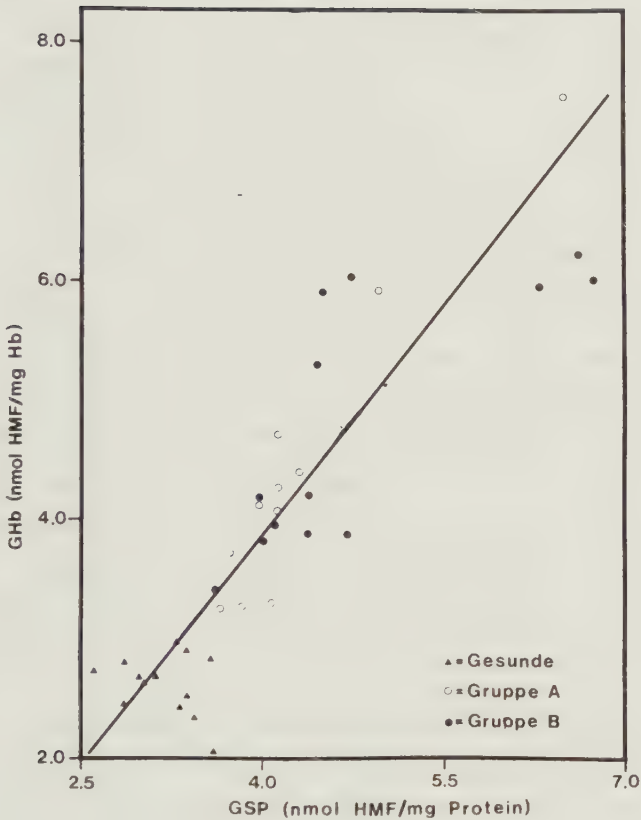


Abb. 6:

Korrelation
des glyco-
sylierten
Serumproteins
mit dem
colorimetrisch
bestimmten
glycosylierten
Hämoglobin
bei Diabetikern
und Stoff-
wechselgesunden

y = GHb ;

x = GSP

Gruppe A : $y = - 2.49 + 1.59 x$ $r = 0.91$

Gruppe B : $y = - 0.47 + 1.13 x$ $r = 0.67$

Gruppe A und B: $y = - 1.08 + 1.26 x$ $r = 0.76$

Gesunde : $y = 3.30 - 0.22 x$ $r = 0.07$
(Kontrollwerte)

Gesunde : $y = 4.17 - 0.47 x$ $r = 0.16$
(zuzüglich der Werte aus dem Glucosebelastungsversuch)

Gruppe A und B: $y = - 1.34 + 1.30 x$ $r = 0.82$
und Kontrollgruppe

V. Oraler Glucosebelastungstest

Nach der oralen Glucosebelastung von gesunden Probanden war weder beim glycosylierten Hämoglobin (GHb) (Tab. 5), noch beim glycosylierten Protein (Tab. 6) eine eindeutige Beeinflussung dieser Werte feststellbar (Abb. 7).

Jedoch fiel beim GHb sowohl am 10. und 20. Tag als auch am 90. Tag nach Belastung eine leichte Erhöhung der Durchschnittswerte über den Mittelwert auf. Diese betrug am 10. und 20. Tag 1.86 % über dem Mittelwert und 4.98 % über dem Ausgangswert. Für den 10. Tag ließ sich eine durchschnittliche Standardabweichung der Einzelbestimmungen ($\overline{sd}$ %) von 3.28 %, für den 20. Tag von 2.55 % errechnen (Tab. 5). Am 90. Tag war die prozentuale Abweichung vom Mittelwert 5.58 % und vom Ausgangswert 8.81 % bei einer durchschnittlichen Standardabweichung der Einzelbestimmungen ($\overline{sd}$ %) von 3.87 % (Tab. 5).

Zusätzlich wurde eine Signifikanzanalyse (Student's t - Test) durchgeführt, mit dem sich keine eindeutig signifikante Veränderung der Werte im Bezug zum Ausgangswert nachweisen ließ. Definitionsgemäß ist diese erst ab einem $p < 0.005$ gegeben. Der Wert des 20. Tages kam jedoch mit $0.1 > p > 0.05$ sehr nahe, beziehungsweise der des 90. Tages mit $0.025 > p > 0.001$ am weitesten an den Signifikanzbereich heran (Tab. 5).

Bei den glycosylierten Serumproteinen trat der höchste Wert eine Stunde nach Belastung auf. Er zeigte eine Abweichung von 3.52 % vom Mittelwert und 1.28 % vom Ausgangswert, bei einer durchschnittlichen Standardabweichung der Einzelbestimmungen ($\overline{sd}$ %) von 1.55 % (Tab. 6). Gegenüber dem 45. Tag war am 60. Tag ein Anstieg des Wertes um 4.5 % zu beobachten, bei einer durchschnittlichen Standardabweichung der Einzelbestimmungen ($\overline{sd}$ %) von 0.94 % (Tab. 6).

Im Student's t - Test war im Bezug zum Ausgangswert an keinem Tag eine signifikante Veränderung festzustellen, p war in jedem Fall > 0.4 .

Tabelle 5: GHb-Werte der Stoffwechselgesunden beim
Glucosebelastungstest

Einheit: nmol HMF/mg Hämoglobin

Zeitpunkt	MW	SD	SE	$\overline{sd}$	$\overline{sd}\%$	p
0	2.61	0.25	0.07	0.07	2.68	-
1 h	2.61	0.22	0.06	0.09	3.45	n.s.
2 h	2.65	0.23	0.06	0.11	4.15	n.s.
1 d	2.64	0.28	0.08	0.08	3.03	0.4 > p > 0.3
10 d	2.74	0.25	0.07	0.09	3.28	0.1 > p > 0.05
20 d	2.74	0.22	0.06	0.07	2.55	0.1 > p > 0.05
30 d	2.65	0.24	0.07	0.10	3.77	n.s.
45 d	2.68	0.28	0.08	0.09	3.36	n.s.
60 d	2.73	0.30	0.09	0.09	3.30	0.2 > p > 0.1
90 d	2.84	0.26	0.08	0.11	3.87	0.025 > p > 0.01

$$\overline{MW} = 2.69$$

MW = Mittelwert aller Probanden

SD = Standardabweichung von MW

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$\overline{sd}$ = durchschnittliche Standardabweichung der Einzelbestimmungen. (Jede Probe wurde doppelt bestimmt und aus den Einzelwerten eine Standardabweichung $\overline{sd}$ errechnet.

$\overline{sd}$ ist der Mittelwert sämtlicher $\overline{sd}$ eines Probenentnahmezeitpunkts.)

$$\overline{sd} \% = \overline{sd} \text{ in Prozent von MW}$$

p = Signifikanzparameter (Signifikanz besteht, falls $p < 0.005$, n.s. = nicht signifikant, d.h. $p > 0.4$).

Tabelle 6: GSP-Werte der Stoffwechselgesunden beim
Glucosebelastungstest

Einheit : nmol HMF/mg Protein

Zeitpunkt	MW	SD	SE	$\overline{sd}$	$\overline{sd}\%$	p
0	3.15	0.31	0.09	0.06	1.88	n.s.
1 h	3.21	0.31	0.09	0.05	1.55	n.s.
2 h	3.16	0.27	0.08	0.04	1.27	n.s.
1 d	3.08	0.34	0.09	0.04	1.30	n.s.
10 d	3.10	0.29	0.08	0.04	1.29	n.s.
20 d	3.10	0.29	0.08	0.04	1.29	n.s.
30 d	3.07	0.32	0.09	0.02	0.65	n.s.
45 d	3.05	0.25	0.07	0.04	1.31	n.s.
60 d	3.19	0.27	0.09	0.03	0.94	n.s.
90 d	3.08	0.33	0.10	0.06	1.95	n.s.

$$\overline{MW} = 3.12$$

MW = Mittelwert aller Probanden

SD = Standardabweichung von MW

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$\overline{sd}$ = durchschnittliche Standardabweichung der Einzelbestimmungen. (Jede Probe wurde doppelt bestimmt und aus den Einzelwerten eine Standardabweichung sd errechnet. $\overline{sd}$ ist der Mittelwert sämtlicher sd eines Probeentnahmezeitpunkts.)

$$\overline{sd} \% = \overline{sd} \text{ in Prozent von MW}$$

p = Signifikanzparameter (Signifikanz besteht, falls $p < 0.005$,

n.s. = nicht signifikant, d.h. $p > 0.4$).

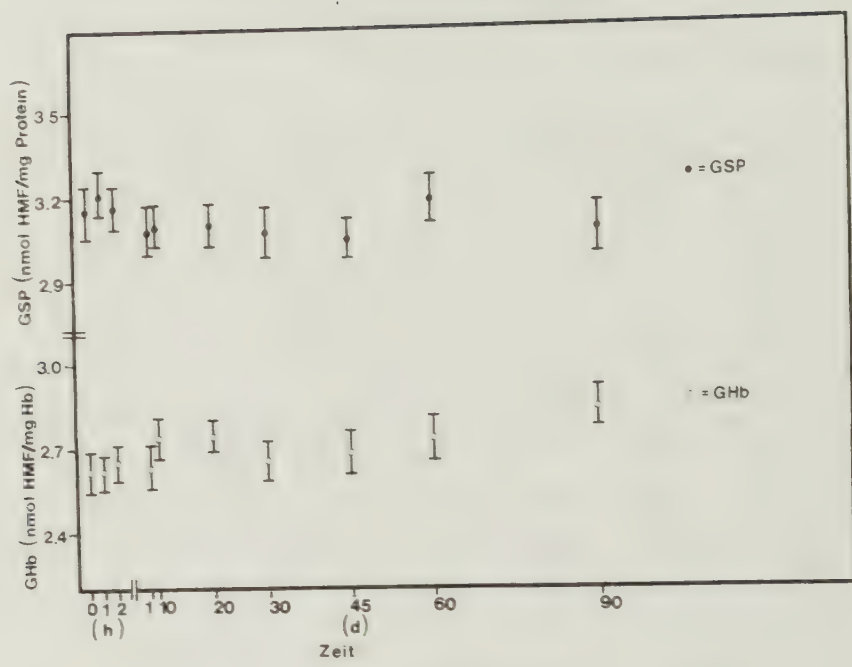


Abb. 7: Oraler Glucosebelastungstest:

Durchschnittliches GSP und GHb $\pm$ SE

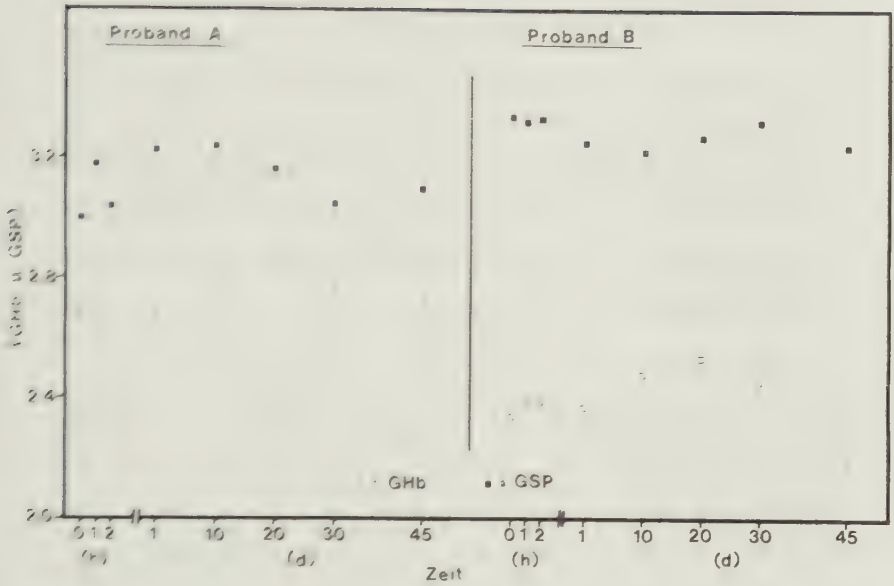


Abb. 8: Verlaufsläufe zweier ausgewählter Probanden
beim Glucosebelastungstest

D. Diskussion

I. Glycosyliertes Serumprotein (GSP)

Das Interesse für die glycosylierten Serumproteine hat in den letzten Jahren stark zugenommen, nachdem man ihrer Bedeutung als flexibleren Langzeitparameter als das glycosylierte Hämoglobin, bedingt durch den schnelleren Umsatz der Serumproteine, in der Überwachung des diabetischen Stoffwechselsituation erkannte.

a) Methode:

Unter den GSP macht das glycosylierte Albumin mit etwa 75 % den größten Anteil aus, entsprechend seiner prozentual hohen Beteiligung an den Gesamtserumproteinen. Die stärkste Glycosylierung findet am α_2 -Globulin statt, welches aber unter den Serumproteinen normalerweise nur mäßig vertreten ist (2 - 3 % der GSP) (11).

McFarland et al. (16) konnten eine Korrelation zwischen der glycosylierten Albumin und dem GSP von $r = 0.99$ feststellen, so daß die weniger aufwendige Bestimmung des GSP bei der glycosylierten Albumins, welche anfänglich meist durchgeführt wurde (18), vorgezogen werden kann.

Bisher wurden etwa folgende Werte für diesen Parameter ermittelt:

McFarland et al. (16) erhielten mit einer modifizierter colorimetrischen Methode nach Flückiger und Winterhalter (17) durch 4,5-stündiges Erhitzen der Serumprobe mit Oxalsäure

bei 100° C Durchschnittswerte von 0.81 nmol HMF/mg Protein für Normalpersonen, die Werte der Diabetiker bewegten sich zwischen 1.54 und 3.97 nmol HMF/mg Protein.

Bei den Untersuchungen von Yue et al. (44) betrugen die Werte für das GSP mit einer colorimetrischen Methode nach 2-stündigem Erhitzen 0.2 - 0.6 nmol HMF/mg Protein für Normalpersonen und Diabetiker.

Ménez et al. (27) erzielten mit der gleichen Methode wie McFarland et al. (26) Normalwerte von durchschnittlich 0.21 nmol HMF/mg Protein, bei Diabetikern betrugen sie im Mittel 0.43 nmol HMF/mg Protein.

Schließlich erhielten Grahnoll und Mitarbeiter (17), ebenfalls mit der gleichen Methode wie McFarland, für Diabetiker einen Durchschnittswert von 0.97 nmol HMF/mg Protein, für Stoffwechselgesunde durchschnittlich 0.51 nmol HMF/mg Protein. Bei sämtlichen Untersuchern lagen die Werte des glycosylierten Hb höher als die des GSP.

Im Gegensatz dazu stellten Day et al. (8) an Ratten mit alloxaninduziertem Diabetes fest, daß Albumin bzw. die Serumproteine bei diesen Tieren etwa 10-fach stärker glycosyliert sind als das Hämoglobin. Sie verwendeten zur Bestimmung dieser Werte auch eine nach Flückiger und Winterhalter (13) modifizierte Methode. Diese Ergebnisse veranlaßten sie zu der Vermutung, daß das GSP und das GHB beim Menschen zumindest ähnliches Verhalten aufweisen.

Problematisch an der Bestimmung des GSP mit der colorimetrischen Methode ist folgender Umstand:

Garlick et al. (14) stellten 1983 in ihren Versuchen fest, daß die Bestimmung der ketoamgebundenen Glucose insofern vom Bindungsort dieses Zuckers abhängig ist, als die an die α -NH₂-Gruppe des Valin gebundene Glucose eine 8-fach stärkere Farbentwicklung aufweist als die an die ϵ -NH₂-Gruppe von Lysin gebundene Glucose. Nachdem die Glucose bei den Serumproteinen hauptsächlich an Lysin gebunden vorliegt, ist deren colorimetrische Bestimmung durch diesen Faktor beeinträchtigt.

Auf Grund der Tatsache, daß auch Garlick et al. (14) die Methode nach Flückiger und Winterhalter verwendet hatten, vermuteten wir, daß die in beschriebener Form mit den Serumproteinen verknüpfte Glucose durch 4.5-stündiges Erhitzen nicht in ausreichendem Maße freigesetzt wird. Aus diesem Grund versuchten wir die Ausbeute an in Form von 5-HMF abgespaltener Glucose zu verbessern und erreichten dies durch Erhitzen der Proben im Autoklaven, d.h. wir erhöhten die Temperatur auf 120° C, wobei gleichzeitig ein Druck von 1.2 atü herrschte.

Dabei erhielten wir Werte, die bei Diabetikern wie Gesunden sowohl insgesamt höher lagen, als auch in beiden Gruppen einen größeren Bereich umfaßten. Mit durchschnittlich 3.12 nmol HMF/mg Protein für Normalpersonen und 4.68 nmol HMF/mg Protein für Diabetiker ergaben sich bei Stoffwechselge-
sunden sogar höhere, bei den Diabetikern etwa gleich hohe

Werte wie für das GHb, bei dem unsere Messungen im Mittel 2.69 nmol HMF/mg Hb für die gesunden Probanden und 4.83 nmol HMF/mg Hb für die Diabetiker ergaben.

Die Methode wurde aber nicht nur dahingehend entscheidend verbessert, daß die Werte nun genauer und differenzierter ermittelt werden können, auch die Reaktionszeit mit Oxalsäure konnte auf eine Stunde und damit auf etwa 1/4 der bisher benötigten Zeit verkürzt werden.

b) Korrelation mit gleichzeit bestimmten Laborwerten

1. Korrelation mit Blut- und Uringlucosewerten:

Die Korrelation des GSP mit Blut- und Uringlucose erwies sich bei unseren Messungen sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B der Diabetiker als sehr schlecht.

Auch Gagnoli et al. (17) konnten zwischen dem GSP und dem gleichzeitig bestimmten Nüchternblutzuckerwert nur eine Korrelation von $r = 0.13$ feststellen.

Diese Tatsache läßt sich darauf zurückführen, daß Blut- und Uringlucosekonzentrationen kurzfristigen, starken Schwankungen unterworfen sind, im Gegensatz dazu das GSP die durchschnittliche Stoffwechselsituation eines längeren Zeitraumes widerspiegelt. In meiner Untersuchung kommt ungünstigerweise hinzu, daß die diabetischen Kinder fast ausschließlich ambulant betreut wurden. Bei stationären Kindern mit häufigen Stoffwechselkontrollen hätten die Durchschnittswerte beider Parameter vielleicht stärker mit der von uns bestimmten, stabilen Form des GSP korreliert.

2. Korrelation mit dem GHb:

Bei den Diabetikern ließ sich eine starke Korrelation des GSP mit dem GHb nachweisen, die besonders bei den als recht gut eingestellt geltenden Patienten festzustellen war.

Die enge Beziehung der beiden Werte, die auch in anderen Arbeiten vorgefunden wurde (17,26,27,29), liegt in ihrer beider Eigenschaft als Langzeitparameter begründet, wobei ja der GHb-Wert Ausdruck der Stoffwechselsituation der vorangehenden 2-3 Monate ist, wohingegen der GSP-Wert vom Stoffwechselzustand der 2-3 Wochen vor der Messung geprägt ist.

Der unterschiedliche Bezugszeitraum erklärt andererseits, daß der Korrelationskoeffizient besonders bei Gruppe A sehr hoch war ($r = 0.91$), deren Stoffwechsellage als relativ stabil angenommen werden kann, so daß keiner der beiden Werte starken Stoffwechselschwankungen ausgesetzt war.

Erstaunlicherweise konnten wir für die gesunden Probanden nur eine sehr niedrige Korrelation ermitteln, wobei aber die Koeffizienten mehrerer Werte von Einzelpersonen sehr unterschiedlich waren. So wies z.B. ein Proband in seinen Werten ein r von nur 0.003 auf, die Werte eines anderen korrelierten aber mit $r = 0.66$ sehr gut. Es ist möglich, daß die schlechten Korrelationen bei einigen Probanden durch unregelmäßige Ernährungsgewohnheiten bedingt sind, vollständig sind sie damit aber sicher nicht zu erklären.

II. Glycosyliertes Hämoglobin

a) Methode:

Auf die große Bedeutung des glycosylierten Hämoglobins in der medizinischen Betreuung der Diabetiker wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Problematisch an der Beurteilung dieses Parameters ist jedoch die große Auswahl der zur Verfügung stehenden Bestimmungsmethoden, die nicht für identische Fraktionen des glycosylierten Hämoglobins spezifisch sind und deren Ergebnisse damit schwer vergleichbar werden. Die von uns verwendete, colorimetrische Methode erwies sich als preisgünstig und relativ leicht zu handhaben und ist zudem unbeeinflusst von den labilen Fraktionen. Abhängig von der unterschiedlichen Durchführung erhalten die einzelnen Autoren jedoch recht uneinheitliche Wertebereiche, die untereinander schlecht verglichen werden können (27, 43).

Die Ionenaustauscherchromatographie ist zwar eine der meist verwendeten und eine weitgehend standardisierte Methode, ihre Aussagekraft verliert jedoch durch die gleichzeitige Bestimmung des labilen, glycosylierten Hämoglobins (es sei denn, die Blutproben wurden vor Auftragen auf die Säule über mehrere Stunden dialysiert, so daß der labil gebundene Zucker abgetrennt wird), die Temperaturanfälligkeit und die Beeinflussung der Ergebnisse durch Urämie, Laktation und andere Stoffwechselveränderungen (43).

In unseren Untersuchungen ergab sich zwischen dem colorimetrisch bestimmten GHb und dem säulenchromatographisch ermit-

telten Hb_{A1} (bei dieser Methode werden ja die übrigen Glyco-hämoglobine nicht mitbestimmt) eine relativ hohe Korrelation von $r = 0.90$.

Klenk et al. (20) verglichen diese beiden Methoden an Stoffwechselgesunden und Diabetikern und erhielten eine etwas engere Korrelation mit $r = 0.95$.

Allerdings muß berücksichtigt werden, daß unsere Blutabnahmen nicht am nüchternen Patienten erfolgten, so daß der deswegen höhere Anteil an labilem Hb_{A1} die Korrelation verschlechtert.

b) Korrelation mit Blut- und Uringlucosewerten:

Wie bei den glycosylierten Serumproteinen war auch beim GHb in beiden Gruppen (A und B) so gut wie keine Korrelation mit den momentanen Blutglucosespiegeln und der Uringlucoseausscheidung vom vorangehenden Tag festzustellen. Auch hier spielt ursächlich die nicht am nüchternen Patienten erfolgte Blutabnahme, jedoch hauptsächlich der unterschiedliche Entstehungsmechanismus der beiden Parameter - GHb als langfristig gebildete, der Blutglucosespiegel als flexible, starken Schwankungen unterworfenen Stoffwechselgröße - eine Rolle. Ähnliche Beobachtungen wurden schon in vielen Arbeiten beschrieben (6, 9, 16).

III. Einfluß einer oralen Glucosebelastung auf das glycosylierte Hämoglobin und Serumprotein

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde bereits in vielen Arbeiten (1,3,6,9,16,19,20,23,28,34) der Einfluß von kurzfristigen Blutglucoseschwankungen auf das glycosylierte Hämoglobin untersucht. Es zeigte sich dabei eine starke Abhängigkeit der labilen bzw. Aldiminform des glycosylierten Hämoglobins vom gleichzeitig bestehenden Blutglucosespiegel und eine relativ ausgeprägte Stabilität der Ketoaminform gegenüber kurzfristigen Änderungen der Glucosekonzentration. Obwohl dies allgemein anerkannt wird, ist das Ausmaß der Stabilität bzw. Instabilität beider Fraktionen umstritten.

Trovati et al. (38) führten bei Gesunden und Diabetikern einen oralen Glucosebelastungstest durch und konnten bei Normalpersonen (nach 100 g Glucosebelastung) keine Veränderung im labilen und stabilen Anteil des Hb_{A1} feststellen, jedoch bei Diabetikern (nach 50 g Glucosebelastung) einen starken Anstieg des labilen Hb_{A1} und eine geringgradige, nicht signifikante Erhöhung des stabilen Hb_{A1} .

Goebel und Fuessl (15) erreichten durch eine 6-stündige Glucosedauerinfusion (1 g/kg x h) bei gesunden Probanden lediglich eine Veränderung des labilen Hb_{A1} , die stabile Fraktion blieb jedoch unbeeinflusst.

Nicht einmal bei Typ-I-Diabetikern (C-Peptid negativ) konnten Compagnucci et al. (6) in täglichen Verlaufskontrollen trotz ausgeprägter Glucosestoffwechsellinstabilität der Patienten eine signifikante Änderung der stabilen Hb_{A1} -Werte feststellen.

Ganz im Gegensatz dazu erwies sich das Hb_{A_1} in den Arbeiten folgender Autoren als weit weniger konstant.

Bei einem Glucosetoleranztest mit 75 g konnten Kitzis et al. (19) zwar bei Normalpersonen keine Veränderungen bezüglich des totalen Hb_{A_1} (stabiles und labiles) feststellen, hingegen ergab sich bei den Diabetikern ein Anstieg des totalen Hb_{A_1} von bis zu 10 % des Ausgangswertes, wovon etwa ein Drittel als stabiles Hb_{A_1} erhalten blieb.

Scobie et al. (33) beobachteten sogar bei einer Belastung von Stoffwechselgesunden mit 50 g Glucose eine Erhöhung des totalen Hb_{A_1} vom 10. - 30. Tag nach Belastung.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Maquart et al. (25), deren gesunde Probanden 30 Tage nach Gabe von 75 g Glucose einen signifikanten Anstieg ihrer totalen Hb_{A_1} -Werte aufwiesen. Über das Ausmaß der Blutglucoseänderung, die zu einer Beeinflussung der labilen bzw. stabilen Fraktion des glycosylierten Hämoglobins führt, gehen die Meinungen der einzelnen Autoren also teilweise erheblich auseinander.

Was das glycosylierte Serumprotein betrifft, so ist dessen Stabilität gegenüber Blutglucoseschwankungen noch wenig untersucht.

In der Studie von Day et al. (8) an Ratten mit alloxan-induziertem Diabetes reagierte das GSP um ein Vielfaches stärker und etwa doppelt so schnell auf die neue Stoffwechselsituation wie das Hb_{A_1} . Ein Anstieg des GSP wurde bereits nach einem Tag festgestellt.

In einer anderen Arbeit (44) wurden Plasmaproteine in vitro mit radioaktiv markierter Glucose (0.1 mmol/l) bei Körpertemperatur inkubiert. Bereits nach ein paar Stunden ließ sich eine meßbare Veränderung des GSP nachweisen.

In Bezug auf die Betreuung der Diabetiker ist natürlich besonders die Beeinflußbarkeit der Ketoaminform des GSP und des GHb von Bedeutung, da nur die relativ stabilen Parameter Aufschluß über die Stoffwechselsituation eines längeren Zeitraumes geben können. Die colorimetrische Methode ist für diese Formen spezifisch und war für unsere Untersuchung der Empfindlichkeit des GHb und des GSP gegenüber einer einmaligen Glucosebelastung besonders geeignet.

a) Reaktion des GHb

Wie Abb. 7 und auch die Kurvenverläufe zweier ausgewählter Probanden (a und b) in Abb. 8 illustrieren, zeigte sich beim GHb ein minimaler Anstieg am 20. und 30. Tag nach Belastung, der innerhalb der doppelten mittleren Standardabweichung ($\overline{sd}$ %) lag und nach dem Student's t-Test nicht als signifikant bezeichnet werden kann. Die Werte entsprechen in ihrem Verlauf in etwa den Ergebnissen von Scobie et al. (33), jedoch halte ich es für problematisch, diesen Anstieg als Reaktion auf die einmalige Zuckergabe zu werten. Die Tatsache, daß am 1. Tag noch keine Erhöhung der Werte, sondern erst am 10. Tag auftrat, ließe sich wohl nur folgendermaßen erklären:

Einen Tag nach der Glucosebelastung liegt der Großteil des neu gebildeten GHb noch in labiler Form vor - wird also von unserer Bestimmungsmethode nicht erfaßt - und geht erst später in die stabile Form über.

Betrachtet man jedoch die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionen (siehe Seite 2), so wird klar, daß diese Annahme sehr unwahrscheinlich ist. Dies wird auch durch die Ergebnisse vieler Arbeiten (1,6,15,16) bestätigt, die ein nahezu paralleles Verhalten der Spiegel von Blutglucose und labilem glycosyliertem Hämoglobin nachweisen, beziehungsweise worin spätestens 3 Stunden nach Normalisierung der Blutglucosekonzentration eine Erhöhung des labilen glycosylierten Hämoglobins nicht mehr festgestellt werden konnte (19).

Auch am 90. Tag nach Belastung wurde bei der Mehrzahl der Probanden ein recht hoher Wert gemessen. Dabei wurde vom 30. bis 90. Tag eine schwach aufsteigende Tendenz der Werte beobachtet. Als Erklärungsversuch könnten folgende Überlegungen in Betracht gezogen werden:

Sämtliche Proben wurden nach Ablauf des Versuches gemeinsam bestimmt, so daß zum Zeitpunkt der Messung die 90-Tage-Probe am frischesten war. Vor dem Einfrieren der Proben wurde den Erythrozyten durch Waschen in physiologischer Kochsalzlösung sämtliche freie Glucose entzogen, so daß das Gleichgewicht der Reaktion Hämoglobin und Glucose zu glycosyliertem Hämoglobin stark auf die Seite des glycosylierten Hämoglobins verschoben wurde. Dieser Umstand konnte die Lösung

eines geringgradigen Anteils von Glucose im Zeitraum der gut 3-monatigen Aufbewahrung bei den älteren Proben bewirkt haben.

Ein ursächlicher Zusammenhang mit der Zuckerbelastung ist jedenfalls unwahrscheinlich.

An den übrigen Kontrolltagen war keine Tendenz feststellbar.

b) Reaktion des GSP

Besonders in Anbetracht der Ergebnisse von Day et al. (8) erwarteten wir eine meßbare Antwort auf die Zuckerbelastung am ehesten beim GSP.

Höchster Wert am Tag der Belastung und insgesamt gesehen war der eine Stunde nach der Zuckeraufnahme. Der Anstieg gegenüber dem Ausgangswert lag jedoch nur im Bereich einer durchschnittlichen Standardabweichung der Einzelbestimmungen ($\overline{sd}$ %) und war im Student's t-Test eindeutig nicht signifikant. Auch der bereits wieder niedrigere 2-Stunden-Wert spricht gegen die Interpretation dieser Erhöhung als schwache Reaktion auf die Glucosebelastung.

Im weiteren Kurvenverlauf fällt ein leichter Anstieg des GSP vom 45. zum 60. Tag nach Belastung auf. In Anbetracht der Halbwertszeit der Serumproteine von etwa 14 Tagen kann jedoch die anfängliche Zuckerbelastung als auslösende Ursache ausgeschlossen werden.

An den übrigen Kontrolltagen bewegten sich die Werte in mäßigen Abweichungen um den Mittelwert.

Sicher darf in diesem Zusammenhang nicht außer Acht gelassen werden, daß - wie oben erwähnt - die Meßgenauigkeit dieses Parameters, auch bei verbesserter Bestimmungsmethode, durch die besondere Bindungsart der Glucose an die Serumproteine beeinträchtigt ist und deshalb geringgradige Veränderungen im Vergleich zum GHb nicht so genau erfaßt werden können.

IV. Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß Blutglucoseerhöhungen nach einer Glucosebelastung von 50 g bei Stoffwechselgesunden nicht ausreichen, um einen signifikanten Anstieg im stabilen Anteil des glycosylierten Hämoglobins und Serumproteins hervorzurufen.

Nach bereits zitierten Autoren findet zwar im Rahmen derartiger Blutglucoseschwankungen eine Mitreaktion der labilen Anteile dieser Werte statt, jedoch führen sie nicht zur Bildung eindeutig meßbarer Fraktionen stabiler Formen, nachdem die Aldiminform, wie Bunn (4) für das glycosylierte Hämoglobin untersuchte, etwa 60mal eher wieder in Hämoglobin und Glucose zerfällt, als daß sie einer Amadoriumwandlung zur Ketoaminform unterworfen wird.

Je länger eine Blutglucoseerhöhung andauert und je stärker sie ausfällt, um so eher kommt es zu einer dauerhaften Glyco-

sylierung. Dabei wird ein Anstieg beider Parameter eben nicht nur durch eine dauerhaft schlechte Einstellung eines Diabetikers hervorgerufen, auch Patienten mit grundsätzlich guter Stoffwechselsituation können bei gehäuften "Diätsünden" hohe Werte als Summe minimaler Glycosylierungen aufweisen.

Unsere Beobachtung, daß die Werte für das GSP bei gesunden Probanden durchschnittlich höher, bei Diabetikern etwa gleich hoch lagen wie die des GHb, obwohl die Serumproteine einem sehr viel schnelleren Umsatz unterworfen sind als das Hämoglobin, lassen darauf schließen, daß die Serumproteine stärker und/oder schneller mit Glucose reagieren als das Hämoglobin.

Die glycosylierten Serumproteine und das glycosylierte Hämoglobin würden sich also wie folgt unterscheiden:

- durch ihren schnelleren Umsatz spiegeln die glycosylierten Serumproteine einen aktuelleren Zeitraum wider als das glycosylierte Hämoglobin,
- auf Grund ihrer größeren Empfindlichkeit gegenüber Blutglucoseerhöhungen stellen sie einen nicht so stabilen Parameter wie die Glycohämoglobine dar.

Auf Grund dessen lassen sich unsere Ergebnisse folgendermaßen interpretieren:

- Stoffwechselgesunde wiesen durchschnittlich einen deutlich höheren GSP-Wert als GHb-Wert auf, nachdem die mäßigen Blutglucoseschwankungen dieser Personengruppe hauptsächlich

einen GSP-Anstieg und weniger eine Veränderung des GHb bewirken.

- Bei den Diabetikern war das Verhältnis der beiden Parameter durchschnittlich zu Gunsten des GHb verschoben, da ja das Hämoglobin bei diesen Probanden auf Grund seiner langen Halbwertszeit sehr viel länger hohen, den Wert verändernden Blutglucosespiegeln ausgesetzt ist als das Serumprotein.

Im Einzelfall waren jedoch folgende Befundkonstellationen, die natürlich in sämtlichen Schattierungen auftraten, anzutreffen:

- beide Werte sind hoch, der des GHb besonders im Extremfall höher, d.h. der Patient befindet sich schon seit längerem in einem schlechten Stoffwechselzustand. So wurde z.B. bei einem neu entdeckten Diabetiker ein GHb von 9.60 nmol HMF/mg Hb bei einem GSP von 7.11 nmol HMF/mg Protein vorgefunden.
- der GHb-Wert ist schlecht, der des GSP relativ gut, d.h. die Stoffwechselsituation hat sich neuerdings gebessert, das hohe GHb stammt noch aus der Zeit der ungünstigen Stoffwechseleinstellung.
- bei relativ niedrigem GHb-Wert ist das GSP deutlich erhöht, d.h. die Stoffwechselsituation hat sich vor kurzem verschlechtert.

In der Verlaufskontrolle eines Diabetikers sollte man also im Zuge einer Stoffwechselverschlechterung primär einen Anstieg des GSP beobachten können.

Andererseits wird normalerweise die Einstellung eines Diabetikers nicht alle 1 - 2 Wochen - was dem Bezugszeitraum des GSP entspricht - überprüft, so daß das GHb als willkommener Kontrollparameter für die Beurteilung längerfristiger Stoffwechseleinstellungen dem GSP überlegen ist, bzw. durch seine Zusatzinformation die Aussagekraft des GSP erhöht.

Beide Parameter stellen also mit ihren unterschiedlichen Eigenschaften eine wertvolle Ergänzung zur Blut- und Urin-glucosekontrolle in der Betreuung der Diabetiker dar.

E. Zusammenfassung

Das glycosylierte Hämoglobin und das glycosylierte Serumprotein stellen ein wichtiges Hilfsmittel in der Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage dar.

Während die Bestimmung der Uringlucoseausscheidung und der Blutglucosekonzentration nur eine stichpunktartige Information über die Stoffwechseleinstellung des Patienten liefern, bieten das glycosylierte Hämoglobin und das glycosylierte Serumprotein die Möglichkeit, sich ein Bild über die Qualität der Einstellung in den vergangenen 1 - 2 Monaten bzw. 1 - 2 Wochen zu verschaffen.

Entsprechend dem wachsenden Interesse für das glycosylierte Serumprotein wollten wir dessen Bestimmungsmethode verbessern. Außerdem sollte die Stabilität beider Parameter gegenüber einer einmaligen, relativ starken Blutglucoseerhöhung und damit ihre Eignung als Langzeitparameter geprüft werden.

Zur Bestimmung des glycosylierten Serumproteins wurde eine colorimetrische Methode verwendet. Sie konnte insofern entscheidend verbessert werden, als durch Erhöhung der Reaktionstemperatur und des Reaktionsdruckes (120° C, 1.2 atü) die Freisetzung der Glucose gesteigert wurde. Wir erhielten Werte, die bei Stoffwechselgesunden wie Diabetikern höher lagen und größere Wertebereiche umfaßten als bisher. Zusätzlich konnte die Reaktionszeit auf etwa 1/4 der bisher benötigten Zeit verkürzt werden.

Das glycosylierte Hämoglobin wurde bei sämtlichen Probanden colorimetrisch, zum Vergleich mit dieser Methode bei ein paar Probanden auch säulenchromatographisch bestimmt. Zwischen den Ergebnissen beider Methoden ergab sich eine gute Korrelation mit $r = 0.90$.

Sowohl beim colorimetrisch bestimmten, glycosylierten Hämoglobin (GHb) als auch beim glycosylierten Serumprotein (GSP) ließen sich praktisch keine Korrelationen mit dem Blutzuckerwert des gleichen Tages und der Uringlucoseausscheidung des vorangegangenen Tages ermitteln.

Untereinander korrelierten die beiden Parameter, GHb und GSP, sehr gut ($r = 0.82$) und besonders eng in der Gruppe der relativ gut eingestellten Diabetiker ($r = 0.91$).

Mit Hilfe einer oralen Belastung von Stoffwechselgesunden mit 50 g Glucose wurde der Einfluß einer kurzfristigen, relativ starken Blutglucoseerhöhung auf das GSP und das GHb untersucht. Die beiden Parameter wurden bis zu 90 Tage nach Belastung bestimmt.

Beim GHb war ein mäßiger Anstieg der Werte am 20. und 30. Tag sowie am 90. Tag nach Belastung nachweisbar.

Im Kurvenverlauf des GSP konnte eine geringgradige Erhöhung 1 h nach Belastung und ein Anstieg der Werte vom 45. auf den 60. Tag festgestellt werden, der aber in Anbetracht der Halbwertszeit der Serumproteine nicht mit der Zuckergabe in Zusammenhang gebracht werden kann.

Sowohl beim GHb als auch beim GSP erwiesen sich die beschriebenen Werteanstiege im Student's t-Test als nicht signifikant.

Blutglucoseerhöhungen nach einer Glucosebelastung von 50 g reichen bei Stoffwechselgesunden also nicht aus, um eine eindeutig meßbare Veränderung bei einem der beiden Parameter hervorzurufen.

Auf Grund der im Vergleich zum GHb höheren Werte des GSP bei Normalpersonen und den etwa gleich hohen bei Diabetikern konnte auf eine größere Empfindlichkeit des GSP gegenüber Blutglucoseerhöhungen geschlossen werden.

Das GSP stellt also eine Stoffwechselgröße dar, die sowohl durch ihren schnelleren Umsatz einen aktuelleren Zeitraum der Stoffwechseleinstellung widerspiegelt, als auch intensiver und/oder schneller mit Glucose reagiert, d.h. sensibler auf Stoffwechselveränderungen anspricht.

Die entscheidenden Vorteile des GHb hingegen bestehen in seiner relativen Unabhängigkeit gegenüber nicht ausgeprägten Blutglucoseschwankungen und in dem auf Grund seiner langen Halbwertszeit sehr viel weiter zurückreichenden Stoffwechselüberblick.

Es sollte demnach keinem der Parameter eine Präferenz gegeben, sondern beide in die Routinekontrolle des Diabetes mellitus einbezogen werden, zumal der Aussagewert eines der beiden Parameter durch die Bestimmung des anderen erhöht wird.

F. Literatur

1. Bolli G., Compagnucci P., Cartechini MG., De Feo P., Santeusanio F. and Brunetti P.: Analysis of Short-Term Changes in Reversibly and Irreversibly Glycosylated Haemoglobin A₁: Relevance to Diabetes Mellitus. Diabetologia (1981) 21: 70-72
2. Boockchin RM., Gallop PM.: Structure of Hemoglobin A₁: Nature of the N-Terminal-Chain Blocking Group. Biochem.Biophys.Res.Comm. 32: 86 (1968)
3. Bottermann P.: Rapid Fluctuations in Glycosylated Haemoglobin Concentration. Diabetologia (1981) 20: 159
4. Bunn F.: Evaluation of Glycosylated Hemoglobin in Diabetic Patients. Diabetes, Vol. 30, July 1981: 613
5. Bunn F., Shapiro R., McManus M., Garrick L., McDonald MJ., Gallop PM., Gabbay KH.: Structural Heterogeneity of Human Hemoglobin A Due to Non-Enzymatic Glycosylation. J.Biol.Chem. 254: 3892-3898
6. Compagnucci P., Cartechini MG., Bolli G., De Feo P., Santeusanio F. and Brunetti P.: The Importance of Determining Irreversibly Glycosylated Hemoglobin in Diabetics. Diabetes Vol. 30, July 1981: 607
7. Daneman D., Tsalikian E., Hengstenberg D., Becker J., Drash Al.: Glycosylated Hemoglobin in Children with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Diabetologia 19: 423-426 (1980)

8. Day JF., Ingebretsen CG., Ingebretsen WR., Baynes JW., Thorpe SR.: Nonenzymatic Glycosylation of Serumproteins and Hemoglobin: Response to Changes in Blood Glucose Levels in Diabetic Rats. *Diabetes* 29: 524-527 (1980)
9. Dietzel J.: Rapid Fluctuations in Glycosylated Haemoglobin Concentration as Related to Acute Changes in Blood Glucose. *Diabetologia* 19: 403-404 (1980)
10. Dietzel J., Kawahara R., Mourits-Andersen T., Østergaard GZ., Kjaergaard J-J.: Changes in Blood Glucose, Glycosylated Hemoglobin and Hemoglobin-Oxygen Affinity Following Meals in Diabetic Children. *Eur.J.Pediatr.* (1981) 137: 171-174
11. Dolhofer R. and Wieland OH.: Glycosylation of Serum Albumin: Elevated Glycosyl-Albumin in Diabetic Patients. *FEBS Letters* Vol. 103, Number 2: 282 (1979)
12. Fitzgibbons JF., Koler RD., Jones RT: Red Cell Age-Related Changes of Hemoglobin A_{1a+b} and A_{1c} in Normal and Diabetic Subjects. *The J.of Clin.Invest.* Vol. 58: 820-824 (1976)
13. Flückiger R. and Winterhalter KH.: In Vitro Synthesis of Hemoglobin A_{1c}. *FEBS Letters* Vol. 71, 2: 356 (1976)
14. Garlick RL. Mazer JS., Higgins PJ. and Bunn HF.: Characterization of Glycosylated Hemoglobins. *J.Clin.Invest.* 71: 1062-1072 (1983)
15. Goebel FD., Fuessl H.: Changes in Glycosylated Haemoglobin after Oral Glucose Load. *British Medical J.*, 284, pp 599 (1982)

16. Goldstein DE., Peth SB., England JD., Hess RL., Da Costa J.:
Effects of Acute Changes in Blood Glucose on Hb_{A1c}.
Diabetes Vol. 21: 623 (1980).
17. Gagnoli G., Tanganelli I., Signorini AM., Tarli P.,
Paoli C.: Non-Enzymatic Glycosylation of Serum Proteins
as an Indicator of Diabetic Control.
Acta diabet.lat. 19, 161, 1982
18. Guthrow CE., Morris MA., Day JF., Thorpe SR., Baynes JW.:
Enhanced Nonenzymatic Glycosylation of Human Serum Albumin
in Diabetes Mellitus. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 76,
No. 9, pp 4258-4261 (1979)
19. Kitzis A., Baudis M., Auge MC., Gachon AM., Dastugue B.,
Wajzman H.: Fast Fluctuations of Glycosylated Hemoglobins.
II. Hemoglobin A_{1c} Determination and Oral Glucose
Tolerance Test. Clinica Chimica Acta 121 (1982) 133-137
20. Klenk DC., Hermanson GT., Krohn RI., Fujimoto EK.,
Mallia AK., Smith PK., England JD., Wiedmeyer H-M.,
Little RR., Goldstein DE.: Determination of Glycosylated
Hemoglobin by Affinity Chromatography: Comparison with
Colorimetric and Ion-Exchange Methods, and Effects of
Common Interferences. Clinical Chemistry Vol. 28,
No 10, 1982, pp 2088
21. Koenig RJ., Peterson CM., Jones RL., Saudek CM., Lehrman M.,
Cerami A.: Correlation of Glucose Regulation and Hemo-
globin A_{1c} in Diabetes Mellitus.
N.Engl.J.Med. 295: 417-421 (1976)

22. Kutter D.: Application du dosage des hémoglobines "rapides" à la surveillance et au diagnostic du diabète sucré.
Schweiz.med.Wschr. 109, 1107-1109 (1979)
23. Leutenegger M., Poynard J.-P., Maquart FX., Borel J.-P.:
Hémoglobines glycosylées et diabète sucré.
Diabète & Métabolisme 1982, 8, 249-263
24. Lev-Ran A.: Glycohemoglobin, Its Use in the Follow-up of Diabetes and Diagnosis of Glucose Intolerance.
Arch.Intern.Med. Vol. 141, May 1981, pp 747-749
25. Maquart FX., Poynard JP., Randoux A., Leutenegger M., Borel JP.: Evolution of Hemoglobin A_{1c} after Oral Glucose Tolerance Test in Normal Subjects.
Biomedicine 1978, 294-296
26. McFarland K., Catalano EW., Day JF., Thorpe SR., Baynes JW.:
Nonenzymatic Glycosylation of Serum Proteins in Diabetes Mellitus. Diabetes Vol. 28, 1979, pp 1011-1014
27. Ménez JF., Meskar A., Lucas D., Darragon T., Floch HH., Bardou LG.: Glycosylated Hemoglobin and Serum Proteins: Semi-Automated Estimation. Clin.Chem.Vol. 27, No 11, 1981, pp 1947-1948
28. Nathan DM.: Labile Glycosylated Hemoglobin Contributes to Hemoglobin A₁ as Measured by Liquid Chromatography or Electrophoresis. Clin.Chem. Vol. 27, No 7 (1981): 1261
29. Parker KM., England JD., Da Costa J., Hess RL., Goldstein DE.: Improved Colorimetric Assay for Glycosylated Hemoglobin. Clin.Chem. Vol. 27, No. 5, 1981: 669

30. Perejda AJ., Uitto J.: Nonenzymatic Glycosylation of Collagen and Other Proteins: Relationship to Development of Diabetic Complications.
Collagen Rel.Res. Vol. 2 (1982), pp 81-88
31. Rahbar S.: An Abnormal Hemoglobin in Red Cells of Diabetics. Clin.Chim.Acta 22, 296-298 (1968)
32. Rahbar S., Blumenfeld O., Ranney HM.: Studies of an Unusual Hemoglobin in Patients with Diabetes Mellitus. Biochem.Biophys.Res.Communic. 36, 838-843 (1969)
33. Scobie IN., Onyanga-Omara F., Singaraveloo M., Forrest ARW., MacCuish AC., Manderson WG.: Changes in Glycosylated Haemoglobin after Oral Glucose Load. Brit.Med.J. (1981), 283, 877-878
34. Shenouda FS., Cockram CS., Baron MD., Tsatsoulis A.: Importance of Short-Term Changes in Glycosylated Haemoglobin. Brit.Med.J. Vol. 284, 1982, pp 1084-1085
35. Shin YS., Stern C., v.Rücker A. and Endres W.: Glycated Haemoglobin and Glycated Albumin: Evaluation of Different Methods in Diabetic Control. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. Vol. 22, 1984, pp 47-51
36. Shin-Buehring Y., Dallinger M., Osang M., Rahm P. and Schaub J.: (1980) Biol. Neonate 38, 300-308
37. Submaraniam CV., Radhakrishnamurthy B., Berenson GS.: Photometric Determination of Glycosylation of Hemoglobin in Diabetes Mellitus. Clin.Chem. Vol. 26, No 12, 1980, pp 1683-1687

38. Trovati M., Lorenzati R., Vitali S., Guerra E., Martire S., Pagano G.: Labile and Stable Glycosylated Hemoglobin during OGTT in Healthy Subjects and Matury-Onset Diabetics. *Acta Diabet.Lat.* 18, 207, 1981
39. Trueb B., Hughes GJ., Winterhalter KH.: Synthesis and Quantitation of Glucitollysine, a Glycosylated Amino Acid Elevated in Proteins from Diabetics. *Analytical Biochem.* 119, 330-334 (1982)
40. Walinder O., Wibell L., Tuvemo T.: Relation between Hemoglobin_{A₁} and Determination of Glucose in Diabetics Treated with and without Insulin. *Diabète & Métabolisme* 1980, Vol. 6, 251-255 (Paris)
41. Williams ML., Savage DCL.: Glycosylated Hemoglobin Levels in Children with Diabetes Mellitus. *Arch. of Dis. in Childhood* 1979, 54, 295-298
42. Winterhalter KH.: Glycosylierte Hämoglobine und ihre Bedeutung beim Diabetes mellitus. *Schweiz.med.Wschr.* 109, 1105-1106 (1979)
43. Winterhalter KH.: Determination of Glycosylated Hemoglobins. *Methods in Enzymologie* Vol. 76, pp 732 (1981)
44. Yue DK., Morris K., McLennan S., Turtle JR.: Glycosylation of Plasma Protein and its Relation to Glycosylated Hemoglobin in Diabetes. *Diabetes* Vol. 29, 1980, pp 296-300.

Lebenslauf

Diemud, Ina, Maria Kaiser, geb. am 22.08.1958 in München

Eltern: Dr.med. Nils Kaiser und
Dr.med. Erika Kaiser, geb. Finsterlin

1964 - 1968 Volksschule in Gauting

1968 - 1977 Otto-von-Taube Gymnasium in Gauting
Abitur 24.07.1977

WS 1977/78 bis Medizinstudium an der Technischen
WS 1983/84 Universität München

18.03.1980 Ärztliche Vorprüfung

26.03.1981 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

18.03.1983 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

23.07.1984 Approbation als Arzt

Seit November 1984 Anstellung als Assistenzärztin
an der Kinderklinik München-Schwabing

